

T細胞活性化抗原CD26とアデノシンデアミナーゼの結合

著者	亀岡 淳一
号	2784
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21216

氏 名（本籍）	かめ 亀	おか 岡	じゅん 淳	いち 一
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 第 2 7 8 4 号			
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 8 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当			
最 終 学 歴	昭 和 59 年 3 月 27 日 東北大学医学部医学科卒業			
学 位 論 文 題 目	T細胞活性化抗原 CD26 とアデノシンデアミナーゼの結合			
	(主 査)			
論文審査委員	教授 阿 部 圭 志 教授 菅 村 和 夫			
	教授 佐 竹 正 延			

論文内容要旨

T細胞活性化抗原 CD26 は、分子量 110kD の膜蛋白で、細胞外ドメインに dipeptidyl peptidase IV 酵素活性を有する。CD26 は、“costimulatory molecule” の 1 つであり、T細胞活性化シグナルを伝達するが、細胞内部分はわずか 6 個のアミノ酸からなり、他のシグナル伝達分子との会合が予想される。このシグナル伝達分子の候補の 1 つが、免疫沈降法で CD26 と共沈される 43kD 蛋白であった。

この 43kD 蛋白を同定するため、免疫アフィニティカラムを用いて CD26 トランスフェクタント (Jurkat 細胞) から 43kD 蛋白を精製した。精製した蛋白のアミノ酸配列を調べたところ、ヒト ADA の第 35~64 および第 172~206 アミノ酸配列と完全に一致した。この結果を次の 3 つのアプローチで確認した。

第 1 に、43kD のバンドが ADA であるかどうかを抗 ADA 抗体を用いて検討した。まず、CD26 トランスフェクタントを抗 CD26、抗 CD29、抗 CD45、抗 MHC class 1 抗体で免疫沈降後、抗 ADA 抗体で免疫プロットしたところ、抗 CD26 抗体で免疫沈降されたサンプルでのみ ADA が検出された。次に抗 ADA 抗体は ^{125}I でラベルされた CD26 トランスフェクタントから 43kD とさらに CD26 と思われる 110kD の 2 つのバンドを沈降させた。この 110kD と CD26 蛋白、および 43kD と ADA 蛋白は、sequential immunodepletion と peptide mapping の 2 種類の方法によりそれぞれ同一性が確認された。

第 2 に、フローサイトメトリーを用いて CD26 と ADA の細胞表面発現の関係を調べたところ、各種 CD26 トランスフェクタントにおいて ADA の発現量と CD26 の発現量は極めて強い相関を示した。また、以前に T細胞を抗 CD26 抗体で処理すると細胞表面の CD26 分子が internalization を起こし downmodulation されることが示されたが、今回の実験では細胞表面の ADA も comodulation された。

第 3 に、これまでの間接的な証拠に加えてより直接的に CD26 と ADA の結合を証明するために、膜通過部分の一部の欠損した CD26 を作製し、それをチャイニーズハムスター卵巣細胞にトランスフェクタントして、その上清から可溶性 CD26 を精製した。この可溶性 CD26 をアガロースビーズに結合させ、 ^{125}I でラベルしたウシ ADA との間で結合実験を行った。可溶性 CD26 ビーズは ^{125}I -ADA と解離定数 65nM で特異的に結合し、抗 ADA 血清でこの結合は阻害された。可溶性 CD26 は細胞外ドメインしかもたないため、この結果は ADA が CD26 の細胞外ドメインと結合することを示している。

ADA は分子量 41kD のユビキタスに発現されている蛋白で、プリン代謝系に働いてアデノシ

ンおよびデオキシアデノシンをイノシンおよびデオキシイノシンにそれぞれ変換する酵素である。ADA 欠損症は、第 20 染色体上の ADA 遺伝子の欠失あるいは変異によって引き起こされる常染色体劣性遺伝疾患であり、ヒト重症複合免疫不全症 (SCID) の病因の約 1/4 を占める。ADA は、主に細胞質で働くと考えられていたが、一部の細胞では ADA binding protein (ADABP) と結合することによって細胞表面にも存在することが知られていた。今回の実験結果は ADABP が CD26 そのものであることを強く示すものである。ヒト ADABP は、“complexing protein” とも呼ばれ、①分子量 108kD、②腎・肝など上皮細胞に分布、③ADA と細胞外で結合、④第 2 染色体に存在、など、これまで報告されている性格はすべて CD26 と一致する。そこで、抗 ADABP 抗体を入手し CD26 トランスフェクタントを用いて免疫沈降法を行なったところ、ADABP のバンドは CD26 のバンドと全く同じ分子量を示した。さらに時を同じくして、ADABP の部分アミノ酸配列が CD26 と一致するという報告がなされ、両者が同一であることが確認された。

T 細胞表面の ADA が T 細胞活性化に関与している場合、2つの可能性が考えられる。第 1 は、ADA が CD26 のシグナル伝達に直接関与している可能性である。第 2 は、ADA が細胞外アデノシンのシグナルを調節している可能性である。この場合は CD26 は ADA 発現の調節役を担っていることになる。

これまで ADA の免疫系への関与は、デオキシ ATP による DNA 合成阻害を中心に、主に細胞内代謝の面から論じられてきた。今回の研究は、ADA が CD26 と結合することによって T 細胞表面上でも機能している可能性を示唆しており、CD26 の T 細胞活性化における新たな役割を提唱している。

審 査 結 果 の 要 旨

一般に、T細胞の活性化には、TCR (T cell receptor)/CD3 複合体を介するシグナル（第1シグナル）の他に、CD2・CD4・CD8・CD28などの accessory 分子を介する第2のシグナルを必要とする。これらの accessory 分子は、in vitro のシステムで、それぞれのモノクローナル抗体を TCR/CD3 抗体と組み合わせることによって強力な T細胞増殖をひきおこすことが可能で、“costimulatory molecule” とも呼ばれており、CD26 もこのうちの1つである。CD26 はさらに、dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) 酵素活性を有するが、天然の基質は明らかでない。

cDNA から予想されるヒト CD26 分子の細胞内部分はわずか6個のアミノ酸からなり、上述の costimulatory 効果を説明するためには、他のシグナル伝達分子との会合が予想される。筆者は本研究で、このシグナル伝達分子の候補の1つが、免疫沈降法で CD26 と共沈される 43kD 蛋白であることに注目し、この 43kD 蛋白を同定するために、免疫アフィニティクロマトグラフィーを用いて 43kD 蛋白を精製し、アミノ酸配列を調べ、ヒトアデノシンデアミナーゼ (ADA) の部分アミノ酸配列と全く一致することを明らかにした。この CD26 と ADA の結合という新しい事実は、種々の方法を用いて確認されている。当初、CD26 のシグナル伝達分子としての機能が予想された 43kD 蛋白が、ADA と判明したことにより、新たな役割が推測される。即ち、(1)これまで CD26 は、T細胞活性化抗原、“costimulatory molecule”，DPP IV酵素活性など様々な役割が指摘されているが、T細胞活性化における primary な機能は明らかでなかった。ADA との結合事実は、CD26 に特異的な機能を解明する手がかりとなり、CD26 の機能を考える上で重要な知見である。(2)これまで ADA の免疫系への関与は、主に細胞内代謝の面から論じられてきた。今回の研究は、ADA が CD26 と結合することによって T細胞表面上でも機能している可能性を示唆しており、ADA の T細胞活性化における新たな役割を示唆しており、ADA の機能を考える上で興味深い。(3)ADA は signal sequence を持たないため、通常のプロセスで細胞表面に発現あるいは分泌されるとは考えにくい。細胞内で CD26 がトランスポーターとして働いている可能性もあるが、細胞外の ADA を CD26 が capture している可能性も否定できず、CD26 と ADA の結合は生化学的、細胞生物学的に興味深い。

以上、本研究は大変独創的で新知見に富み、十分学位に価すると考えられる。